

京都御苑固有植物カワセミソウ（サギゴケ科）の系統的位置付け

Phylogenetic Position of *Mazus quadriprotuberans* N. Yonezawa (Mazaceae), a Perennial Plant Endemic to the Kyoto-Gyoen National Garden, Japan.

山 本 将 也*
YAMAMOTO Masaya

Mazus quadriprotuberans is an endemic species in the Kyoto-Gyoen National Garden, Japan. Approximately 1500 bp of chloroplast DNA under maximum likelihood criteria were analyzed to elucidate the relationship of *M. quadriprotuberans* with 17 other *Mazus* species. No sequence divergence was found between *M. quadriprotuberans* and *M. miquelii* collected in Japan. The well-resolved phylogenetic tree revealed a robust sister relationship between the two species, even if *M. miquelii* was found to be non-monophyletic. This polytypic *M. miquelii* shows deep divergence from plants grown in China and Japan, highlighting a need for further taxonomic study.

キーワード：カワセミソウ, サギゴケ, 分子系統解析, 葉緑体 DNA

Key words : *Mazus quadriprotuberans*, *Mazus miquelii*, molecular phylogenetic analysis, chloroplast DNA

I. はじめに

Mazus Lour. 属は花喉部に多数の毛状突起を持つことで特徴付けられる植物群で、東アジアを中心にヒマラヤからオセアニアにかけて広い地域に分布している (Li 1954, Hsieh 2000). 従来の分類体系では、*Mazus* 属はゴマノハグサ科 (Scrophulariaceae) あるいはハエドクソウ科 (Phrymaceae) に含まれていたが、分子系統解析の結果、*Dodartia* Linn. 属及び *Lancea* Hook. f. et Thoms. 属と共に新設されたサギゴケ科 (Mazaceae) に移行された (Chase *et al.* 2016). 40 種ほどで構成されるサギゴケ科の中で、*Mazus* 属が最大のグループであるという認識に誤りはないだろうが、それぞれの種の認識についてはいまだに議論が絶えない。実際に、属内の種数に関する見解は 10 ~ 30 種以上とするものまで幅広く (Bonati 1908, Barker 1991, Yang 1979), 形態変異に富む *Mazus* 属の分類には形態情報だけでなく、分子情報を利用することが必要不可欠といえる (例えば Umemoto *et al.* 2015, Deng *et al.* 2016).

日本には 4 種の *Mazus* 属植物が分布している：サギゴケ *Mazus miquelii* Makino, トキワハゼ *M. pumilus* (Burm.f.) Steenis, ヒメサギゴケ *M. goodenifolius* (Hornem.) Pennell, カワセミソウ *M. quadriprotuberans* N. Yonezawa (遠藤 2017). このうち、カワセミソウを除く 3 種は東アジアや東南アジア (オセアニア) にかけて広い分布域をもつものであり、特にサギゴケ・トキワハゼについては、日本で広く見られる普通種で、市街地から里山 (山地) まで多様な環境に生育している。これに対して、カワセミソウは唯一の日本固有種であるが、

一見すると奇妙で理解に苦しむ場所に自生する。

カワセミソウは 1998 年に京都御苑 (京都市) 内のよく手入れされた芝生の上で初めて発見され、著しく伸長した花筒部 (Fig. 1) をもつ日本産 *Mazus* 属の新種として 2000 年に報告された (Yonezawa 2000). この新種記載以降、タイプ産地である京都御苑の他に新たな自生地は未だに見つかっていない。さらに興味深いことは、カワセミソウが唯一生育する御苑内では、サギゴケとトキワハゼが至る所で見られ、カワセミソウはそれらの近縁種とほとんど同所的に生えていることである (Yonezawa 2000). 花形態では明瞭に他分類群と区別されるカワセミソウであるが、多年草で走出枝を出すという特徴がサギゴケと共通しているため (トキワハゼとヒメサギゴケは一年草あるいは越年草で走出枝がない)、形態的にはサギゴケと類縁関係があると考えられている (Yonezawa 2000). しかしながら、多年草で走出枝を出す *Mazus* 属の仲間は中国や台湾にもいくつか知られ (*M. alpinus*, *M. longipes*, *M. surculosus*, *M. fauriei* など), 地理的分布や形態的特徴のみでカワセミソウの系統的位置を議論することは容易ではなく、推測の域を出ないと言わざるを得ない。むしろ、カワセミソウとサギゴケが隣り合って生育していることを踏まえると、両者の間に深い系統的な分化が存在する可能性も否定できない。そこで、本研究では、*Mazus* 属の葉緑体 DNA を用いた分子系統解析を行い、京都御苑のみに自生するカワセミソウの系統的位置を明らかにすることを目的とした。

II. 材料と方法

京都御苑内での植物採集は全面的に禁止されているため、カワセミソウについては京都府立植物園（京都市左京区）で系統保全されている株から遺伝子解析用の葉を採取した。また、近縁種と考えられるサギゴケについても、御苑の近くを流れる鴨川に群生している集団（35°00'N, 135°46'E）から葉を採取した。

シリカゲルで乾燥させた葉サンプルから CTAB 法でゲノム DNA を抽出し（Doyle 1990）, Yamamoto *et al.* (2017) の方法に従って葉緑体 DNA 上のスパーサー領域 2 つ（*psbA-trnH*, *trnL-trnF*）とイントロン領域 1 つ（*rps16* intron）を増幅した。PCR 増幅には SapphireAmp Fast PCR Master Mix（TaKaRa）, シークエンス反応には Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit（Applied Biosystems）を用い、ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer（Applied Biosystems）で塩基配列を決定した。これに加えて、GenBank から *Mazus* 属植物 17 種と *Lancea tibetica* の塩基配列情報を取得し（Table 1）, それぞれの領域ごとにデータセットを作成した。各データセットは MEGA7（Kumar *et al.* 2016）で編集し、

MUSCLE（Edgar 2004）を用いて塩基配列の多重アライメントを行なった。アライメント後、3 つのデータセットを SequenceMatrix v1.7.8（Vaidya *et al.* 2011）で結合し、これを系統解析用のデータセットとした。

塩基配列に対する最適な進化モデルの推定は ModelFinder（Kalyaanamoorthy *et al.* 2017）で行い、K3Pu+F+G4 モデルが選択された。分子系統樹の作成には最尤法系統解析を行う W-IQ-TREE（Trifinopoulos *et al.* 2016）を使用、推定された進化モデルに基づいて 1,000 回のブートストラップ解析を行い（ultrafast bootstrap method, Hoang *et al.* 2017）, 得られた系統樹の信頼性を評価した。得られた系統樹は FigTree（Rambaut 2014）で可視化・編集し、*Lancea tibetica* を外群とする有根系統樹を作成した。

III. 結果および考察

まず、京都御苑固有種であるカワセミソウと京都市内に自生するサギゴケの葉緑体 DNA 領域の塩基配列を決定した。3 領域（*psbA-trnH*, *trnL-trnF*, *rps16* intron）合計で 1430 塩基を解読したところ、両種の塩基配列は

Table 1 GenBank accession number of 18 *Mazus* species used in the phylogenetic analysis.

Species	Voucher No. (herbarium)	Locality	GenBank accession No.		
			<i>psbA-trnH</i>	<i>trnL-trnF</i>	<i>rps16</i> intron
<i>Mazus quadripotuberans</i>	-	Kyoto, Japan	LC506183	LC506187	LC506185
<i>M. miquelii</i>	-	Kyoto, Japan	LC506182	LC506186	LC506184
<i>M. miquelii</i>	NK11186 (KUN)	Yunnan, China	KX783461	KX783522	KX783503
<i>M. miquelii</i>	Deng2165 (KUN)	Yunnan, China	KX783453	KX783515	KX783495
<i>M. miquelii</i>	Deng423 (KUN)	Yunnan, China	KX783451	KX783514	KX783496
<i>M. pumilus</i>	Li15512 (KUN)	Yunnan, China	KX783454	KX807207	KX807202
<i>M. alpinus</i>	Sunhang11322 (KUN)	Taiwan	KX783458	KX783519	KX783500
<i>Mazus</i> sp.	Sunhang11307 (KUN)	Taiwan	KX783459	KX783520	KX783501
<i>M. goodenifolius</i>	Sunhang11459 (KUN)	Taiwan	KX783460	KX783521	KX783502
<i>M. procumbens</i>	zdg6074 (KUN)	Hubei, China	KX783456	KX783517	KX783498
<i>M. fauriei</i>	Sunhang11248 (KUN)	Taiwan	KX783457	KX783518	KX783499
<i>M. caducifer</i>	Kun35025 (KUN)	Anhui, China	KX783455	KX783516	KX783497
<i>M. surculosus</i>	KUN0472212 (KUN)	Yunnan, China	-	KX783512	KX783493
<i>M. longipes</i>	Deng1941 (KUN)	Guizhou, China	KX783450	KX783513	KX783494
<i>M. pulchellus</i>	KUNdt093 (KUN)	Hunan, China	KX783448	KX783511	KX783492
<i>M. omeiensis</i>	nie1976 (KUN)	Sichuan, China	KX783449	KX807208	KX807203
<i>M. celsioides</i>	YIF-0093 (KUN)	Xizang, China	KX783464	KX783525	-
<i>M. lanceifolius</i>	zdg4447 (KUN)	Hubei, China	KX783446	KX783509	KX783490
<i>M. sunhangii</i>	zdg4142 (KUN)	Hubei, China	KX783504	KX783523	KX783504
<i>M. pumilio</i>	Pagest.s.n.2021829 (KUN)	Australia	KX783444	KX783507	KX783488
<i>M. novazeelandiae</i>	dtA68 (KUN)	New Zealand	KX783445	KX783508	KX783489
<i>Lancea tibetica</i>	dt108 (KUN)	Yunnan, China	KX783443	KX807205	KX807200

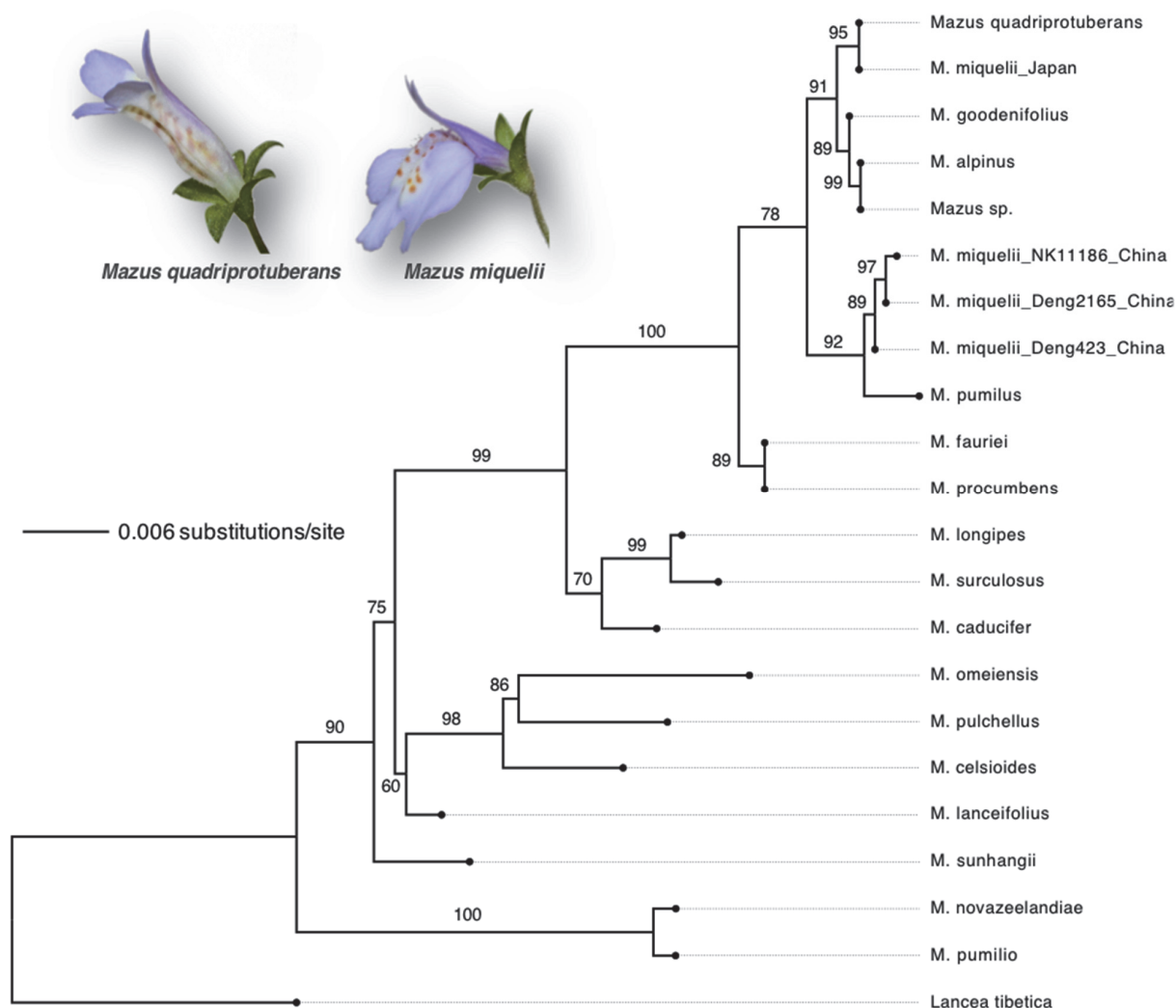


Figure 1 The maximum-likelihood tree of *Mazus quadriprotuberans* and related species based on three chloroplast genes: *psbA-trnH*, *trnL-trnF* and *rps16* intron. Maximum-likelihood bootstrap values are shown above branches.

100 % 一致し、違いは見つからなかった。本研究で新たに得られた2種の塩基配列情報は GenBank に登録した (LC506182-LC506187)。

次に、カワセミソウを含む *Mazus* 属植物 18 種を用いた葉緑体 DNA3 領域に基づく最尤系統樹を Figure 1 に示す。それぞれの葉緑体 DNA 領域を結合し、多重アライメントを行なった後の総塩基数は 1442 となり、Variable site の数は 181、Parsimony-informative site の数は 92 であった。

得られた系統樹のトポロジー自体は、概ね *Mazus* 属の網羅的な系統解析を行なった先行研究 (Deng *et al.* 2016) の結果と変わらないが、本研究によって二つの新たな知見が得られた。一つ目は、本研究の主目的である

属内におけるカワセミソウの系統的位置である。系統解析の結果、カワセミソウは全く同じ塩基配列をもつ京都市内に自生するサギゴケと共に、日本及び台湾に自生する *Mazus* 属種 (*M. goodenifolius* 及び *M. alpinus*) で構成されるクレードに含まれ、このクレードは高いブートストラップ値で支持された。その姉妹クレードを構成するトキワハゼ等も含めて、これらの種はいずれも *Mazus* 節 (Sect. *Mazus*) に属するグループである。現在、*Mazus* 属内は花茎の形状や子房の毛の有無などによって3つの節 (Sects. *Trichogynus*, *Mazus*, *Lanceifoliae*) に整理されているが (Yang 1979)、本研究によってカワセミソウが *Mazus* 節に含まれること、そしてサギゴケと姉妹種の関係にあることが示された。これは、Yonezawa

(2000) の形態情報に基づく分類学的考察を支持するものである。

二つ目は、中国・台湾・朝鮮半島・日本に広く分布するサギゴケが種として単系統性を示さなかったことである。得られた系統樹では、中国（雲南省）と日本で採取されたサギゴケはそれぞれ別のクレードに含まれ、多系統となっている。これは、中国と日本に分布するサギゴケの間に別種レベルに相当する系統的な分化があることを示唆しているが、形態種と分子系統樹上の種との間に不一致が生じることは、特に植物の場合それほど珍しいことではない（例えば Kato and Koi 2018）。そのような不一致をもたらす原因としては、単に種そのものが多系統であったり、隠蔽種（cryptic species）が含まれているケースもあれば、祖先多型の incomplete lineage sorting や、種間交雑によって起こる遺伝子浸透などが真の遺伝子系統樹を歪めてしまうこともしばしばある（Funk and Omland 2003）。これらの要因を精査するためには、核 DNA を用いた系統解析や集団遺伝解析が必須であるため、現段階ではなぜサギゴケが多系統となるのか明確な理由はわからない。また、実際に中国で採取されたサギゴケの標本を確認することができないため、誤同定の可能性も完全に否定することはできない。今後、複数の DNA 領域を用いた解析で広域に分布する集団の系統関係やデモグラフィを明らかにすることができれば、その実態を把握することができるだろう。

本研究によって、京都御苑にしか生育しないカワセミソウの姉妹種が同所的に生育するサギゴケであることが明らかになった。加えて、種間に DNA 塩基配列上の差異が無いことから、その種分化イベントはかなり最近の出来事であったと推察される。一般に、植物の場合は動物よりも近縁種間の交雑や繁殖干渉が起りやすいため、種分化後間もない姉妹種同士が隣り合って生育している事実を説明することは容易ではなく、その維持機構は進化生物学的にも大変興味深い。その一方で、カワセミソウの風変わりな分布や形態の特徴から、奇形や雑種である可能性を指摘されることもある（藤井他 2006）。ただ、核 DNA の internal transcribe spacer (ITS) 領域においても両種の塩基配列にはほとんど違いが見られないため（山本 未発表）、カワセミソウが雑種起源である可能性は極めて低いといえるだろう。今後は、カワセミソウの詳細な進化的起源や、その特異な花形態が持つ適応的意義を明らかにしていく中で、分類学的検討を重ねていきたいと考えている。

IV. 謝辞

本研究を進めるにあたり、カワセミソウの葉をご提供下さった京都府立植物園の戸部博植物園長ならびに平塚健一氏、そして長澤淳一客員教授（京都府立大学）

の三氏に深く感謝申し上げます。本研究は文部科学省科学研究費補助金（課題番号：19K16219）の助成を受けて行われたものです。

V. 引用文献

1. Barker W. R. (1991) A taxonomic revision of *Mazus* Lour. (Scrophulariaceae) in Australasia. *Papers and proceedings of the Royal Society of Tasmania* **124**: 85-94.
2. Bonati G. (1908) Contribution à l' Etude du genre *Mazus* Lour. *Bull Herb Boissier* **8**: 525-539.
3. Chase M. W., Christenhusz M. J. M., Fay M. F., Byng J. W., Judd W. S., Soltis D. E., ... and Stevens P. F. (2016) An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society* **181**: 1-20.
4. Deng T., Zhang X. S. Kim C., Zhang J. W, Zhang D. G. and Volis S. (2016) *Mazus sunhangii* (Mazaceae) , a New Species Discovered in Central China Appears to Be Highly Endangered. *PLOS ONE* **11**: e0163581.
5. Doyle J. J. (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* **12**: 13-15.
6. Edgar R. C. (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* **32**: 1792-1797.
7. 遠藤泰彦 (2017) サギゴケ科. 大橋広好・門田裕一・邑田仁・米倉浩司・木原浩編, 改訂新版 日本の野生植物 5. pp. 144-145, 平凡社. 東京.
8. 藤井伸二, レッドデータブック近畿研究会 (2006) 近畿地方の植物分布に関する最近の知見と文献一覧. 分類 **6**: 139-150.
9. Funk D. J. and Omland K. E. (2003) Species-level paraphyly and polyphyly: frequency, causes, and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **34**: 397-423.
10. Hoang D. T., Chernomor O., Von Haeseler A., Minh B. Q. and Vinh L. S. (2017) UFBoot2: improving the ultrafast bootstrap approximation. *Molecular Biology and Evolution* **35**: 518-522.
11. Hsieh T. H. (2000) Revision of *Mazus* Lour. (Scrophulariaceae) in Taiwan. *Taiwania* **45**: 131-146.
12. Kalyaanamoorthy S., Minh B. Q., Wong T. K., von Haeseler A. and Jermin L. S. (2017) ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nature Methods* **14**: 587.
13. Kato M. and Koi S. (2018) Molecular phylogeny of *Zeylanidium* (Podostemaceae) showing a new cryptic species from Thailand. *Acta Phytotaxonomica et*

- Geobotanica* **69**: 1-9.
14. Kumar S., Stecher G. and Tamura K. (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* **33**: 1870-1874.
 15. Li H. L. (1954) The genus *Mazus* (Scrophulariaceae) . *Brittonia* **8**: 29-38.
 16. Rambaut A. (2014) FigTree v1.4.2. Online. Available from internet <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/> (accessed 2019-8-1)
 17. Trifinopoulos J., Nguyen L. T., von Haeseler A. and Minh B. Q. (2016) W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. *Nucleic Acids Research* **44**: 232-235.
 18. Umemoto H., Yokota M. and Kokubugata G. (2015) Reconsideration for Occurrence of *Mazus goodenifolius* (Phrymaceae) in Miyazaki Prefecture, Japan using Molecular and Morphological Data. *Bulletin of the National Museum of Nature and Science. Series B* **41**: 61-67.
 19. Vaidya G., Lohman D. J. and Meier R. (2011) SequenceMatrix: concatenation software for the fast assembly of multi-gene datasets with character set and codon information. *Cladistics* **27**: 171-180.
 20. Yamamoto M., Ohtani M., Kurata K. and Setoguchi H. (2017) Contrasting evolutionary processes during Quaternary climatic changes and historical orogenies: a case study of the Japanese endemic primroses *Primula* sect. *Reinii*. *Annals of Botany* **120**: 943-954.
 21. Yang H. P. (1979) *Mazus Lour.* Tsoong P. C. and Yang H. P. (eds.) . *Flora reipublicae popularis sinicae Tomus* 67. pp. 172-196, Science Press. Beijing.
 22. Yonezawa N. (2000) *Mazus quadriprotuberans* N. Yonezawa (Scrophulariaceae) , a new species from Kyoto, Japan. *Journal of Phytogeography and Taxonomy* **48**: 1-9.